昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, August 2011, 54(8): 933 - 937 ISSN 0454-6296

蜕皮激素与其受体 EcR-USP 的转录调控机制

李 康[1,2], 李 胜[2,*], 曹 阳[1]

(1. 华南农业大学动物科学学院, 广州 510642; 2. 中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所, 上海 200032)

摘要: 蜕皮激素 20-羟基蜕皮酮(20-hydroxyecdysone, 20E)是一种典型的类固醇激素, 主导调控昆虫的蜕皮、变态、生殖等重要生理过程。20E 受体 EcR-USP 已被鉴定近 20 年, 20E 与其受体复合物的转录调控机制也有了许多重要突破。已有研究表明: (1)20E 受体由核受体 EcR 和 USP 形成; (2)EcR-USP 异源二聚体在分子伴侣蛋白复合物的协助下获得 DNA 结合活性; (3)20E 通过解除共阻遏因子和募集共激活因子来激活 EcR-USP 异源二聚体并启动下游基因的转录; (4)20E-EcR-USP 配体-受体复合物引发 20E 初级应答基因的表达, 由 20E 初级反应基因编码的转录因子诱导表达的 20E 次级应答基因级联放大 20E 信号, 从而调控昆虫蜕皮、变态、生殖等生理过程。

关键词: 蜕皮激素; 20-羟基蜕皮酮(20E); EcR-USP; 转录调控; 分子蛋白伴侣蛋白复合物; 共阻遏因子; 共激活因子; 细胞程序化死亡

中图分类号: Q965 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2011)08-0933-05

Transcriptional regulation by 20-hydroxyecydsone and its nuclear receptor EcR-USP

LI Kang[1,2], LI Sheng[2,*], CAO Yang[1] (1. College of Animal Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

Abstract: The molting hormone, 20-hydroxyecdysone (20E), is an insect steroid hormone which plays a dominant role in the regulation of insect molting, metamorphosis, reproduction and other physiological processes. The 20E nuclear receptor, EcR-USP, has been identified for 20 years, and several breakthroughs have been recently made in understanding the transcriptional regulation mechanisms of 20E-EcR-USP. Recent research indicates that: (1) the 20E receptor is composed of two nuclear receptor molecules, *i. e.*, EcR and USP. (2) The EcR-USP heterodimer obtains DNA binding activity with the assistance of a molecular chaperone-containing heterocomplex. (3) 20E transcriptionally activates the EcR-USP heterodimer by releasing co-repressors and recruiting co-activators. (4) The ligand-receptor complex, 20E-EcR-USP, triggers a transcriptional cascade, including transcription of the 20E primary-response genes and the 20E secondary-response genes induced by transcription factors encoded by the 20E primary-response genes, to regulate physiological and developmental events.

Key words: Ecdysone; 20-hydrxoecdysone (20E); EcR-USP; transcriptional regulation; MCH; co-repressor; co-activator; PCD

类固醇激素 20-羟基蜕皮酮(20-hydroxyecdysone, 20E)是昆虫蜕皮激素的主要活性形式, 在昆虫的变态发育过程中起着重要的调控作用。20E 诱导幼虫蜕皮和幼虫-蛹-成虫变态, 包括幼虫老旧组织的程序化细胞死亡(programmed cell death, PCD)与成虫干细胞的分裂分化, 并对绝大多数昆虫的生殖功能有促进作用(Wu *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2009a)。本文从 20E 的受体组成、DNA 结合活性、转录和功能等 4 个方面较为详尽地综述了近年来 20E 与其受体复合物转录调控机制的相关研究进展。

1 核受体 EcR 和 USP 组成 20E 受体

已知有 150 多种转录因子属于核受体超家族。

基金项目: 国家自然科学基金项目(30870299, 30870335); 上海市重点项目(10JC1416700); 中国科学院"百人计划"择优支持项目; 中国科学院知识创新工程项目(KSCX-EW-J-12)

作者简介: 李康, 男, 1985 年生, 硕士研究生, 主要从事昆虫生理生化和家蚕遗传研究, E-mail: likang0118@yahoo.com.cn

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: shengli@sippe.ac.cn

收稿日期 Received: 2011-03-01; 接受日期 Accepted: 2011-05-11

其中一些核受体结合小分子亲脂性配体(类固醇激素、甲状腺激素和类维生素 A 等),从而诱导靶基因的表达(Lapenna *et al.*, 2008)。核受体含有 2 个主要结构域:一个高度保守的 DNA 结合域(DNA binding domain, DBD),一般含有 2 个锌指结构用来和特异的 DNA 序列(hormone response elements, HREs)结合;一个相对不太保守的配体结合域(ligand binding domain, LBD),位于 DBD 的羧基端,结合相应的配体(Reinking *et al.*, 2005)。

核受体通常以同源或异源二聚体形式与配体结合。黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 等昆虫的 20E 受体是由 *EcR* 和 *USP* 两个基因编码的核受体蛋白组成的异源二聚体,其中 EcR 直接和 20E 结合,USP 直接和 EcR 结合(Riddiford *et al.*, 2001; Riddiford *et al.*, 2003)。*EcR* 编码 3 种蛋白亚型:EcR-A, EcR-B1 和 EcR-B2, *USP* 编码与脊椎动物受体 RXR 同源的一种蛋白。尽管 EcR 和 USP 可以与其他核受体形成异源二聚体并行使生理功能,但 EcR-USP 异源二聚体是最主要的 20E 受体,在转录水平上传递 20E 信号(Beckstead *et al.*, 2005)。

2 EcR-USP 在分子伴侣蛋白复合物的协助下获得 DNA 结合活性

脊椎动物的类固醇激素受体需要一种分子伴侣蛋白复合物(molecular chaperone-containing heterocomplex, MCH)的协助才能获得 DNA 结合活性。MCH 由分子伴侣 Hsp90 和 Hsc70,分子伴侣相互作用蛋白 Hop, Hip 和 p23,以及前肽异构酶类 FKBP51 和 FKBP52 等组成。MCH 具有辅助蛋白或蛋白复合体正确折叠的作用(Pratt and Toft, 1997)。

与脊椎动物类固醇受体相似,在由 Hsp90, Hsc70, Hip, Hop, FKBP53 和 p23 组成的 MCH 协助下,果蝇 20E 受体 EcR-USP 异源二聚体获得 DNA 结合活性,结合到 20E 应答元件(20E response element, EcRE)上。一旦 EcR-USP 异源二聚体与 EcRE 结合,MCH 就从蛋白质-DNA 复合体 EcR-USP-EcRE 上解离下来。在组成 MCH 的 6 种蛋白中,已经证实 Hsp90 和 Hsc70 对于果蝇 20E 受体复合物的活性是必须的,并且与 EcR 存在遗传互作(Arbeitman and Hogness, 2000)。烟草天蛾 *Maduca sexta* 的 Hsc70 不但参与 MCH 的组成,使 EcR-USP 获得 DNA 结合活性,而且在 EcR-USP 异源二聚体的聚集过程中具有负反馈调控作用(Rybczynski and Gilbert, 2000)。

3 20E 通过解除共阻遏因子和募集共激活因子来启动 EcR-USP 的转录

对于一些配体激活的核受体而言,配体的结合首先解除与核受体相互作用的共阻遏因子,然后募集共激活因子与核受体相互结合,从而激活核受体的转录功能(Xu *et al.*, 1999)。

当配体 20E 不存在的条件下,一些共阻遏因子结合在 EcR-USP 异源二聚体上,并抑制 20E 下游基因的转录。例如,一种 EcR 结合蛋白 SMRTER 与脊椎动物核受体共阻遏因子 SMRT 和 N-CoR 结构上不尽相同,但在功能上极为相似。SMRTER 通过与 Sin3A 和组蛋白脱羧酶 Rpd3/HDAC 形成复合体而起抑制作用。果蝇的一种 EcR 突变体无法结合 SMRTER,虫体出现发育缺陷,并导致部分致死。这说明 EcR-USP 的共阻遏因子 SMRTER 是果蝇正常变态发育所必须的(Tsai *et al.*, 1999)。另一共阻遏因子 DART1(果蝇精氨酸甲基转移酶 1)和哺乳动物 PRMT1 同源,可对组蛋白 H4 上的精氨酸残基进行甲基化修饰。干扰虫体 *dart1* 后,20E 受体复合物中 EcR 的活性得到增强。此外,报告基因显示 *dart1* 突变的虫体中,EcR 的转录活性上升(Kimura *et al.*, 2008)。

20E 结合 EcR-USP 形成配体-受体复合物 20E-EcR-USP 之后,上述共阻遏因子解离下来,并且募集一些共激活因子启动下游基因的转录。例如,*taiman* 编码一种类固醇激素受体共激活因子。TAIMAN 结合在配体-受体复合物 20E-EcR-USP 之上,显著增强了 20E 下游基因的转录(Bai *et al.*, 2000)。TRR 是一种组蛋白赖氨酸甲基转移酶,对组蛋白 H3 上赖氨酸 4 进行三重甲基化。*trr* 缺失后 20E 一个下游基因 *Br-C* 的 mRNA 水平显著降低,推测 TRR 通过改变包含 EcRE 的染色体构象而起转录激活作用(Sedkov *et al.*, 2003)。CARMER 是一种组蛋白精氨酸甲基转移酶,在 20E 引发的细胞凋亡过程中具有重要促进作用。在 *carmer* 缺失的果蝇突变系中,20E 诱导的 PCD 受阻,推测 CARMER 与 20E-EcR-USP 结合来激活 20E 介导的细胞死亡因子的转录(Cakouros *et al.*, 2004)。DEK 是一种组蛋白分子伴侣,研究发现磷酸化的果蝇 dDEK 可以和 EcR 结合并作为 EcR 的共激活因子来促进蜕皮激素下游基因的转录表达(Sawatsubashi

et al., 2009)。DOR 是蜕皮激素受体的另一种共激活因子，在昆虫的变态发育过程中发挥作用。DOR 与 EcR 结合是 EcR 获得最大转录活性所必需的。dDOR 缺失的果蝇呈现出一系列类似蜕皮激素功能缺失的表型，例如气门外翻受损，唾液腺无法正常退化和蛹期致死等现象。此外，dDOR 敲除的果蝇明显变得瘦小。进一步研究发现 dDOR 的表达可以被胰岛素信号途径中的 FOXO 所抑制(Francis *et al.*, 2010)。PARP 是一种聚 ADP-核糖体聚合酶，参与蜕皮激素级联系统的发生。在昆虫 S2 细胞系中发现果蝇 PARP 可以激活 20E 诱导的 EcR 的活性，并且以依赖配体的方式和 EcR 结合，通过改变染色质构象来调控 EcR-USP 引发的 20E 初级应答基因的转录表达(Sawatsubashi *et al.*, 2004)。NURF 是一种依赖于 ATP 的染色质重塑复合物，通过协助核糖体的运动调控基因的转录。缺失 NURF 的果蝇无法完成幼虫到蛹的转变，而且增加了蜕皮激素受体的显负性突变。此外，纯化的 NURF 以依赖配体 20E 的方式和 EcR 结合，显示 NURF 是蜕皮激素核受体的直接共激活因子(Badenhorst *et al.*, 2005)。总之，共阻遏因子和共激活因子对 20E-EcR-USP 的转录调控具有非常重要的调控作用。

4　20E 通过 EcR-USP 诱导下游基因表达和传递 20E 信号

20E 调控幼虫蜕皮的分子机制已经基本了解清楚，主要通过两个调控层次来完成的。首先，20E-EcR-USP 促进气门腺 Inka 细胞合成蜕壳启动激素(ecdysis-triggering hormone，ETH)，同时抑制 ETH 的分泌，对 ETH 进行双重调控。当血淋巴 20E 滴度下降后，羽化激素(eclosion hormone，EH)促进 ETH 的分泌，最终 ETH 启动昆虫蜕皮(郭恩恩等，2008)。其次，配体-受体复合物 20E-EcR-USP 启动 *Br-C*，*E74*，*E75* 和 *E93* 等 20E 初级应答基因的表达；这些初级应答基因然后触发天冬氨酸凋亡酶编码基因 *Dronc* 和 *Drice*，死亡激活因子基因 *reaper* 和 *hid* 等 20E 次级应答基因的表达，最终导致昆虫变态和蜕皮过程中的细胞自噬和凋亡(Thummel，1996；Yin and Thummel，2005；Spindler *et al.*，2009；Liu *et al.*，2009b)。

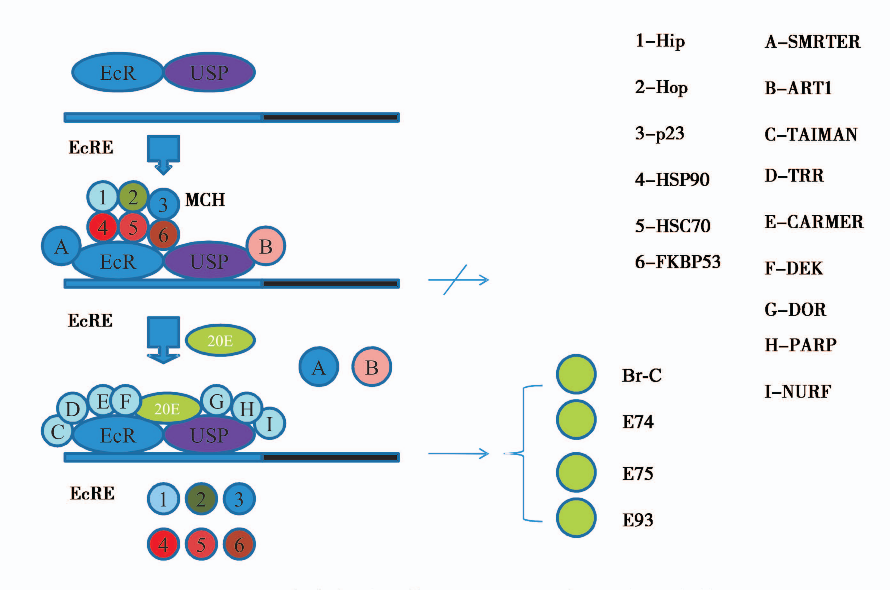


图 1　蜕皮激素与其受体 EcR-USP 的转录调控机制模型

Fig. 1　A model for transcriptional regulation by 20-hydroxyecydsone and its nuclear receptor EcR-USP

1：Hip，hsp70 作用蛋白 Hip，hsp70-interacting protein；2：Hop，hsp70/90 组织蛋白 Hop，hsp70/90-organizing protein；3：p23，端粒酶结合蛋白 Telomerase binding protein；4：HSP90，热休克蛋白 90 Heat shock protein 90；5：HSC70，热休克蛋白 70 Heat shock protein 70；6：FKBP53，亲免蛋白 An immunophilin. A：SMRTER，EcR 结合蛋白 An EcR-interacting protein；B：ART1，精氨酸甲基转移酶 1 Arginine methyltransferase 1；C：TAIMAN，类固醇激素受体共激活因子 A steroid hormone receptor coactivator；D：TRR，组蛋白赖氨酸甲基转移酶 Histone methyltransferases；E：CARMER，组蛋白精氨酸甲基转移酶 Arginine-histone methyltransferase；F：DEK，组蛋白分子伴侣 Histone chaperone；G：DOR，EcR 共激活因子 Coactivator of EcR；H：PARP，聚 ADP-核糖体聚合酶 Poly(ADP-ribose) polymerase；I：NURF，染色质重塑复合物 Chromatin remodeling complex.

5　结论与展望

以上详细介绍了 20E-EcR-USP 转录调控机制。综上所述，除 EcR-USP 以外，一些 MCH、共阻遏因子和共激活因子参与了转录调控(图 1)。

昆虫变态发育涉及一系列基因的有序表达，这些基因的表达受到 20E 信号的严格调控，改变这些基因的表达都会影响昆虫的变态发育(Hiruma and Riddiford, 2009)。深入了解 20E-EcR-USP 转录调控机制有着广泛的应用前景：在害虫防治方面，20E 拮抗剂和类似物与 EcR-USP 相互作用，是非常有效的昆虫生长调节剂；在益虫利用方面，在桑叶中添加 20E 可缩短上簇时间；用转基因方法中断家蚕幼虫-蛹变态过程中的 20E 信号，可造成蛹期滞育而达到鲜茧缫丝的目的；在医学方面，激素调控的配体-受体信号机制为新药物的开发提供理论基础，20E 激活 EcR-USP 的基因开关在临床上开始尝试(Baker *et al.*, 2000)；在生物学基础研究上，20E-EcR-USP 转录调控是配体激活的核受体转录调控的先导模型(Lapenna *et al.*, 2008)。

参 考 文 献 (References)

Arbeitman MN, Hogness DS, 2000. Molecular chaperones activate the *Drosophila* ecdysone receptor, an RXR heterodimer. *Cell*, 101: 67 - 77.

Badenhorst P, Xiao H, Cherbas L, Kwon SY, Voas M, Rebay I, Cherbas P, Wu C, 2005. The *Drosophila* nucleosome remodeling factor NURF is required for ecdysteroid signaling and metamorphosis. *Gene Dev.*, 19: 2540 - 2545.

Bai J, Uehara Y, Montell DJ, 2000. Regulation of invasive cell behavior by taiman, a *Drosophila* protein related to AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast cancer. *Cell*, 103: 1047 - 1058.

Baker KD, Warren JT, Thummel CS, Gilbert LI, Mangelsdorf DJ, 2000. Transcriptional activation of the *Drosophila* ecdysone receptor by insect and plant ecdysteroids. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 30: 1037 - 1043.

Beckstead RB, Lam G, Thummel CS, 2005. The genomic response to 20-hydroxyecdysone at the onset of *Drosophila* metamorphosis. *Gen. Biol.*, 6: 1474 - 7596.

Cakouros D, Daish TJ, Mills K, Kumar S, 2004. An arginine-histone methyltransferase, CARMER, coordinates ecdysone-mediated apoptosis in *Drosophila* cells. *J. Biol. Chem.*, 279: 18467 - 18471.

Francis VA, Zorzano A, Teleman AA, 2010. dDOR is an EcR coactivator that forms a feed-forward loop connecting insulin and ecdysone signaling. *Curr. Biol.*, 20: 1799 - 1808.

Guo EE, Li S, Cao Y, 2008. The hormonal regulation network of insect molting. *Acta Entomol. Sin.*, 34(2): 370 - 374. [郭恩恩, 李胜, 曹阳, 2008. 昆虫蜕皮的激素网络调控. 昆虫学报, 34(2): 370 - 374]

Hiruma K, Riddiford LM, 2009. The molecular mechanisms of cuticular melanization: the ecdysone cascade leading to dopa decarboxylase expression in *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 39: 245 - 253.

Kimura S, Sawatsubashi S, Ito S, Kouzmenko A, Suzuki E, Zhao Y, Yamagata K, Tanabe M, Ueda T, Fujiyama S, Murata T, Matsukawa H, Takeyama K, Yaegashi N, Kato S, 2008. *Drosophila* arginine methyltransferase 1 (DART1) is an ecdysone receptor co-repressor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 371: 889 - 893.

Lapenna S, Friz J, Barlow A, Palli SR, Dinan L, Hormann RE, 2008. Ecdysteroid ligand-receptor selectivity - exploring trends to design orthogonal gene switches. *FEBS J.*, 275: 5785 - 5809.

Liu Y, Liu HH, Liu SM, Wang S, Jiang RJ, Li S, 2009a. Hormonal and nutritional regulation of insect fat body development and function. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 71: 16 - 30.

Liu Y, Sheng ZT, Liu H, Wen D, He Q, Wang S, Shao W, Jiang RJ, An S, Sun Y, Bendena WG, Wang J, Gilbert L, Wilson TG, Song Q, Li S, 2009b. Juvenile hormone counteracts the bHLH-PAS transcription factors MET and GCE to prevent caspase-dependent programmed cell death in *Drosophila*. *Development*, 136: 2015 - 2025.

Pratt WB, Toft DO, 1997. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr. Rev.*, 18: 306 - 360.

Reinking J, Lam MMS, Pardee K, Sampson HM, Liu S, Yang P, Williams S, White W, Lajoie G, Edwards A, Krause HM, 2005. The *Drosophila* nuclear receptor E75 contains heme and is gas responsive. *Cell*, 122: 195-207.

Riddiford LM, Cherbas P, Truman JW, 2001. Ecdysone receptors and their biological actions. *Vitam. Horm.*, 60: 1 - 73.

Riddiford LM, Hiruma K, Zhou XF, Nelson CA, 2003. Insights into the molecular basis of the hormonal control of molting and metamorphosis from *Manduca sexta* and *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 33: 1327 - 1338.

Rybczynski R, Gilbert LI, 2000. cDNA cloning and expression of a hormone-regulated heat shock protein (hsc 70) from the prothoracic gland of *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 30: 579 - 589.

Sawatsubashi S, Maki A, Ito S, Shirode Y, Suzuki E, Zhao Y, Yamagata K, Kouzmenko A, Takeyama K, Kato S, 2004. Ecdysone receptor-dependent gene regulation mediates histone poly (ADP-ribosyl) ation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 320: 268 - 272.

Sawatsubashi S, Murata T, Lim J, Fujiki R, Ito S, Suzuki E, Tanabe M, Zhao Y, Kimura S, Fujiyama S, Ueda T, Umetsu D, Ito T, Takeyama K, Kato S, 2009. A histone chaperone, DEK, transcriptionally coactivates a nuclear receptor. *Genes Dev.*, 24: 159 - 170.

Sedkov Y, Cho E, Petruk S, Cherbas L, Smith ST, Jones RS, Cherbas P, Canaani E, Jaynes JB, Mazo A, 2003. Methylation at lysine 4 of histone H3 in ecdysone-dependent development of *Drosophila*. *Nature*, 426: 78-83.

Spindler KD, Hönl C, Tremmel CH, Braun S, Ruff H, Spindler-Barth M, 2009. Ecdysteroid hormone action. *Cell. Mol. Life Sci.*, 66: 3837 – 3850.

Thummel CS, 1996. Flies on steroids – *Drosophila* metamorphosis and the mechanisms of steroid hormone action. *Trends Genet.*, 12: 306 – 310.

Tsai CC, Kao HY, Yao TP, McKeown M, Evans RM, 1999. SMRTER, a *Drosophila* nuclear receptor coregulator, reveals that EcR-mediated repression is critical for development. *Mol. Cell.*, 4: 175 – 186.

Wu Y, Parthasarathy R, Bai H, Palli SR, 2006. Mechanisms of midgut remodeling: Juvenile hormone analog methoprene blocks midgut metamorphosis by modulating ecdysone action. *Mech. Dev.*, 123: 530 – 547.

Xu L, Glass CK, Rosenfeld MG, 1999. Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 9: 140 – 147.

Yin VP, Thummel CS, 2005. Mechanisms of steroid-triggered programmed cell death in *Drosophila*. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 16: 237 – 243.

（责任编辑：赵利辉）